

# Resistencia mecánica del pericardio de ternera utilizado en la construcción de bioprótesis cardíacas tratadas con dodecil sulfato sódico

GARCÍA PÁEZ J.M., JORGE-HERRERO E., CARRERA SAN MARTINA\*, GARCÍA SESTAFE J.V.\*\*\*, MILLAN I., CORDONA.\*, MARTÍN MAESTRO M., CALERO P., ROCHA A., CASTILLO-OLIVARES J.L.  
Departamento de Cirugía Experimental, y Servicio de Bioestadística. Clínica Puerta de Hierro, Madrid.  
\*Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales, Universidad Politécnica, Madrid.  
\*\*\*Universidad Nacional de Educación a Distancia.

## Resumen

Para mitigar la calcificación de las bioprótesis cardíacas fabricadas con pericardio de ternera o válvulas porcinas se aplican tratamientos químicos posteriores al entrecruzamiento con glutaraldehído.

Uno de los tratamientos ensayados ha sido el surfactante dodecil sulfato sódico (DSS). Este detergente inhibe, en modelos experimentales, en pequeños animales, la calcificación del pericardio de ternera utilizado en la construcción de bioprótesis cardíacas.

Estudiamos el comportamiento mecánico del pericardio tratado, con este detergente, comparándolo con un tratamiento control con glutaraldehído (GA) 0.625% durante 24 horas.

Se ensayaron al esfuerzo de tracción muestras pareadas, es decir, cortadas de forma contigua y en la misma dirección del corte, tratadas respectivamente con glutaraldehído (grupo de control) y con dodecil sulfato sódico (DSS). El tejido tratado con DSS fue a su vez incubado con dos tiempos diferentes 2 o 24 horas respectivamente y posteriormente tratados con glutaraldehído (GA). En las muestras tratadas dos horas con DSS, se observó un estrés de rotura similar al de las parejas que recibieron el tratamiento de control. Los valores estuvieron comprendidos entre 8.42 y 15.81 MPa. Las muestras tratadas con DSS, 24 horas perdieron su resistencia mecánica. El estrés de rotura medio osciló entre 1.77 y 1.95 MPa, existiendo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ), cuando se las comparaba con el grupo control tratado con GA.

Por otra parte cuando se analizó la elasticidad, las series tratadas con DSS y dos horas de incubación presentaron en la región elástica, módulos de elasticidad menores, cuando se comparan con valores similares de las series de control, dejando patente la mayor elasticidad del biomaterial tratado con DSS.

Desde el punto de vista de investigación aplicada la buena correlación obtenida, cuando se comparan mediante mínimos cuadrados las muestras pareadas, permite predecir el comportamiento mecánico de una muestra, conocido el comportamiento de la muestra adyacente o pareja.

## Introducción

Las bioprótesis cardíacas mecánicas tienen salvo incidentes (1) una larga duración, pero exigen el uso de anticoagulantes orales de forma continuada con un riesgo de hemorragia y por lo tanto de morbilidad y mortalidad añadida. El uso de bioprótesis evita este grave inconveniente. Los pacientes solo permanecen anticoagulados alrededor de tres meses tras el implante, pero tienen el riesgo, de su menor durabilidad. En un 30% de los casos se produce fallo valvular por degeneración del tejido (des

### Correspondencia

J.M. García Páez.  
Servicio de Medicina Preventiva  
Clínica Puerta de Hierro.  
San Martín de Porres 2,  
28035 Madrid.  
Spain  
Email: [ejorge&hpth.insalud.es](mailto:ejorge&hpth.insalud.es)

garro, perforaciones etc.) o bien por calcificación del mismo. Por ello es necesario el recambio valvular en gran número de casos antes de los 10 años de su implante (2-8)

Por otra parte, la combinación de distintos materiales para la fabricación de las prótesis (suturas, anillos semiflexibles de distintos polímeros, recubrimientos de Dacron etc.), o el efecto del diseño en el tejido biológico puede producir tensiones en la estructura o fuerzas de cizalladura que podrían desgarrar el tejido. Este estrés de cizalladura sería responsable también de la escasa durabilidad de los velos construidos con biomateriales para la fabricación de las bioprótesis cardiacas (9).

Otro de los objetivos necesarios para obtener una bioprótesis cardiaca aceptable es intentar disminuir o impedir el depósito de calcio en dichas bioprótesis mediante diversos tratamientos químicos (10-12). Hasta la fecha, no hay un tratamiento químico efectivo contra la calcificación. Se están ensayando tratamientos antimineralizantes con cationes (13-15), fármacos como difosfonatos (16-17), con proteoglicanos (18-21) o tratamientos para eliminar fosfolípidos como dodecil sulfato sódico (DSS), cloro/metanol o etanol (22-27). Se considerará adecuado el tratamiento que retarde o impida la calcificación, pero, a su vez, no produzca efectos perjudiciales en el comportamiento mecánico del tejido, es decir que no disminuya su resistencia mecánica ni su elasticidad.

Teniendo presentes estos dos factores, el objetivo de este trabajo es estudiar el comportamiento mecánico del pericardio de ternera utilizado en la fabricación de velos valvulares cuando se somete a un tratamiento químico con DSS (10). Estudiaremos mediante un ensayo de estrés a tracción,

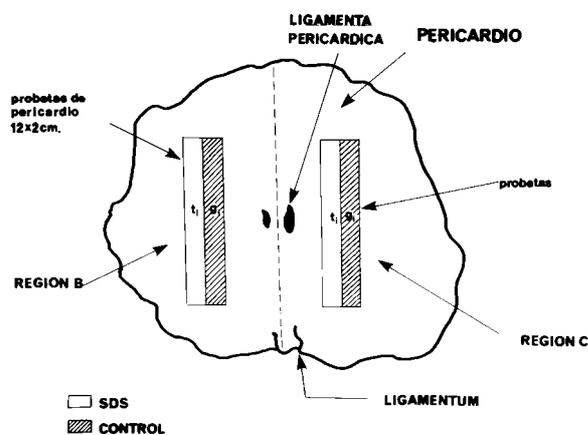
la resistencia y el comportamiento mecánico de muestras de pericardio de ternera tratadas con dodecil sulfato sódico (DSS) con incubaciones de 2 horas y de 24 horas y tratadas posteriormente con GA de forma similar al grupo control, frente a tejido tratado con glutaraldehído.

## Material y métodos

El pericardio de ternera fue obtenido de reses de 6 a 12 meses de edad, recién sacrificadas en un matadero local y transportadas en suero salino (cloruro sódico al 0.9%) isotónico helado hasta el laboratorio. El tejido fue limpiado manualmente y el pericardio fue cortado en muestras de 12 por 2 cm.

Los espesores se midieron en 10 posiciones a lo largo de la probeta mediante un micrómetro digital, Mitutoyo (Eleccount serie E:A33/8) que tiene una precisión a 20° de +/- 3 micras, descartándose aquellas cuyo espesor estuviera fuera de un rango entre 300 y 700 micras

Se ensayaron 56 muestras de pericardio de ternera en un ensayo de tracción axial hasta su rotura. Las muestras se obtuvieron de las regiones B y C según el diagrama modificado de Purinya (28) (figura 1). Todas las muestras fueron pareadas es decir cortadas de forma contigua y en la misma dirección del corte desde la raíz al apex. Una muestra se consideró control (B o C según la zona de obtención), recibiendo tratamiento control con glutaraldehído y la muestra gemela o contigua (B o C según la zona de obtención) recibió además tratamiento con dodecil sulfato sódico (DSS) según se describe a continuación.



**Figura 1** Diagrama modificado de Purinya, regiones B y C de donde se obtienen las muestras de pericardio.  $t_1$  muestras tratadas con dodecil sulfato sódico DSS.  $g_1$  muestras tratadas con glutaraldehído.



**Figura 2** Vista general de la máquina de ensayos Instron.

### Tratamientos químicos

Grupo de control: Las muestras que actuaron como grupo de control fueron tratadas con glutaraldehído al 0.625% en un tampón de fosfato sodico 0.1 M a pH 7.4 durante 24 horas.

Grupo DSS: Se trataron con DSS 0.1% en NaCl 0.15 M, en dos incubaciones diferentes de 2 ó 24 horas mas un tratamiento adicional con GA en condiciones similares al grupo de control.

En una primera parte del ensayo se compararon 16 muestras (ocho tomadas de la zona B y ocho de la C) tratadas con glutaraldehído, (series gB y gC), con 16 muestras tomadas también, ocho de cada zona B y C respectivamente, contiguas o pareadas con las anteriores pero pretratadas con DSS con una incubación de 2 horas, series dss-B, dss-C. En una segunda parte del ensayo se compararon 12 muestras (seis tomadas de la región B y seis de la C) tratadas con glutaraldehído, series GB y GC), con 12 ,tomadas también de las zonas B y C y pareadas o contiguas con las anteriores pero que habían sido pretratadas con dodecil sulfato sódico con una incubación de 24 horas, series DSS-B y DSS-C.

Todas las muestras fueron sometidas a un test de tensión hasta su rotura, usando un una maquina de ensayos Instron TTG4 (Instron Ltd..High Wycombe, Buck,UK), que proporciona los valores de deformación de las muestras para cada valor del estrés aplicado. Las muestras fueron ancladas mediante mordazas dejando una luz libre de 50 cm y evitando el deslizamiento de las probetas.

### Estudio matemático

Con los datos aportados por la maquina se pudo realizar el ajuste matemático que establece, en cada muestra, la relación entre el estrés en MPa (y) y la deformación producida en tanto por uno (x). Esta relación fue de la forma  $y = ax^2 + bx$ . Se obtuvo la

**Tabla 1a** Estrés a rotura en MPa . Valores medios de las series

Series	Nº muestras	X	D. Típica	Cuasi
GB	8	9.871	4.929	5.270
Dss-B	8	8.424	6.260	6.692
GC	8	11.069	5.603	5.990
Dss-C	8	15.819	4.285	4.581

D. Típica: Desviación típica  
Cuasi : Cuasi desviación típica  
X es la media

curva promedio estrés/deformación de las series ensayadas. También se realizó la comparación de las funciones que definían las curvas estrés/deformación en cuanto a sus discrepancias (ensayos pareados) para valores por debajo del límite elástico y próximos al estrés de trabajo 0.250 MPa (29), (valores de x entre 0.05 y 0.10). Esta comparación se realizó mediante mínimos cuadrados, obteniendo una recta de regresión y los correspondientes coeficiente de correlación (r). Para el análisis se los resultados a rotura se utilizó el estadístico t de Student para el contraste de las medias entre la series con muestras pareadas.

## Resultados

### Rotura

Los resultados a rotura se expresan en las tablas 1a y 1b. En la tabla 1a se expresan los resultados de los valores medios en MPa al estrés de rotura de las series pareadas cuando se comparó respectivamente, la incubación de 2 horas con DSS (series dss-B y dss-C) y el tratamiento de control con glutaraldehído (series gB y gC). En este caso no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación de los valores medios. En la serie gB el valor medio fue de 9.87 MPa frente a 8.42 en la serie dss-B, y de 11.06 MPa en la serie gC frente a 15.81 MPa en la serie dss-C.

En la tabla 1b se expresan los resultados de los valores medios en MPa del estrés de rotura de las series pareadas . Cuando se comparó respectivamente, la incubación en 24 horas con DSS (series DSS-B y DSS-C) y el tratamiento control con glutaraldehído (series GB y GC), aun siendo muestras similares (pareadas por contigüedad), existieron diferencias estadísticamente significativas

**Tabla 1b** Estrés a rotura en MPa. Valores medios de las series

Series	Nº muestras	X	D. típica	cuasi
GB	6	29.152*	8.199	8.982
DSS-B	6	1.769*	0.753	0.825
GC	6	26.879**	8.699	9.526
DSS-C	6	1.951**	0.496	0.544

\*\_\_\_\_\*,\*\*\_\_\_\_\*\*: diferencias a nivel significativo (p<0.001)

D. Típica: Desviación típica  
Cuasi : Cuasi desviación típica  
X es la media.

( $p < 0.001$ ) en los resultados medios, (29.15 MPa en la serie GB frente a 1.76 MPa en la serie DSS-B). De igual manera ocurre entre las series GC, 26.87 MPa, y la serie DSS-C, 1.95 MPa.

### Análisis matemático de las curvas stress/deformación

Este análisis puso de manifiesto que cuando las muestras se ensayaban a tracción las funciones que mejor se ajustaban eran parábolas cuadráticas de la forma  $y = ax^2 + bx + c$ , incidentes en el origen ( $c=0$ ). En las tablas 2, 3, 4 y 5 se expresan los valores de los coeficientes "a", "b" así como los valores del coeficiente de determinación  $R^2$ .

Los valores promedio de las observaciones en cada serie fueron:

Serie gB:  $y = 129.808x^2 - 0.923x$

Serie dss-B:  $y = 87.149x^2 - 0.578x$  (tratamiento 2 horas)

Serie gC:  $y = 47.561x^2 + 3.998x$

Serie dss-C:  $y = 96.840x^2 - 2.901x$  (tratamiento 2 horas)

Serie GB:  $y = 509.648x^2 + 58.090x$

Serie DSS-B:  $y = 0.958x^2 + 3.376x$  (tratamiento 24 horas)

Serie GC:  $y = 480.846x^2 + 31.274x$

Serie DSS-C:  $y = 0.636x^2 + 4.302x$  (tratamiento 24 horas)

Donde  $y$  es el estrés en MPa y  $x$  es el porcentaje de alargamiento en tanto por uno. En las figuras 3 y 4 se expresan gráficamente estos resultados.

Se estudiaron también las discrepancias entre las muestras tratadas con glutaraldehído y las diversas incubaciones con DSS (2 y 24 horas) muestras pareadas. Se presentan los resultados parciales a modo de ejemplo, de la comparación mediante mínimos cuadrados (ajuste de la recta de regresión) para valores de  $x$  entre 0.05 y 0.1 y los coeficientes de correlación obtenidos ( $r$ ):

$gB_8 \dots dss-B_8$   $y(dss) = 0.08532 + 0.49995x(g)$ ,  $r = 0.999$

$gC_4 \dots dss-C_4$   $y(dss) = 5.47416 + 7.5681x(g)$ ,  $r = 0.995$

$GB_1 \dots DSS-B_1$   $y(DSS) = 0.03898 + 0.01166x(G)$ ,  $r = 0.99$

$GC_5 \dots DSS-C_5$   $y(DSS) = 0.09275 + 0.04426x(G)$ ,  $r = 0.999$

**Tabla 2** Funciones matemáticas  $Y = ax^2 + bx$  (coeficientes a, b y  $R^2$ )

Probetas	A	B	$R^2$
gB <sub>1</sub>	247.574	-5.165	0.994
gB <sub>2</sub>	167.411	14.259	0.997
gB <sub>3</sub>	18.073	3.357	0.982
gB <sub>4</sub>	214.184	-9.631	0.997
gB <sub>5</sub>	43.575	-1.427	0.986
gB <sub>6</sub>	124.602	3.666	0.996
gB <sub>7</sub>	176.448	-17.030	0.973
gB <sub>8</sub>	46.600	4.584	0.996
dss-B <sub>1</sub>	311.353	-0.295	0.997
dss-B <sub>2</sub>	165.552	-11.287	0.940
dss-B <sub>3</sub>	-3.405	6.070	0.985
dss-B <sub>4</sub>	98.246	-2.876	0.986
dss-B <sub>5</sub>	28.758	-1.045	0.986
dss-B <sub>6</sub>	66.000	-1.146	0.993
dss-B <sub>7</sub>	23.223	0.978	0.979
dss-B <sub>8</sub>	7.469	4.675	0.9926

$R^2$  coeficiente de Determinación

$Y$  es el estrés en MPa,  $x$  es la deformación en tanto por uno

**Tabla 3** Funciones matemáticas.  $Y = ax^2 + bx$  (coeficientes a, b y  $R^2$ )

Probetas	A	B	$R^2$
gC <sub>1</sub>	74.841	6.437	0.997
gC <sub>2</sub>	38.365	4.750	0.991
gC <sub>3</sub>	15.553	7.015	0.981
gC <sub>4</sub>	132.870	-0.689	0.981
gC <sub>5</sub>	26.759	-3.390	0.976
gC <sub>6</sub>	36.904	5.788	0.986
gC <sub>7</sub>	38.656	6.833	0.959
gC <sub>8</sub>	16.541	5.162	0.983
dss-C <sub>1</sub>	89.326	-4.549	0.995
dss-C <sub>2</sub>	70.117	-0.562	0.985
dss-C <sub>3</sub>	109.866	-10.096	0.993
dss-C <sub>4</sub>	155.433	-8.330	0.995
dss-C <sub>5</sub>	38.535	0.647	0.974
dss-C <sub>6</sub>	152.939	-2.588	0.993
dss-C <sub>7</sub>	85.462	5.910	0.988
dss-C <sub>8</sub>	73.048	-3.643	0.989

$R^2$  Coeficiente de Determinación

$Y$  es el estrés en MPa,  $x$  es la deformación en tanto por uno.

### Valores medios de las series g-B, dss-B, g-C, dss-C

Estrés en ordenadas (MPa); deformación en abscisas (%)

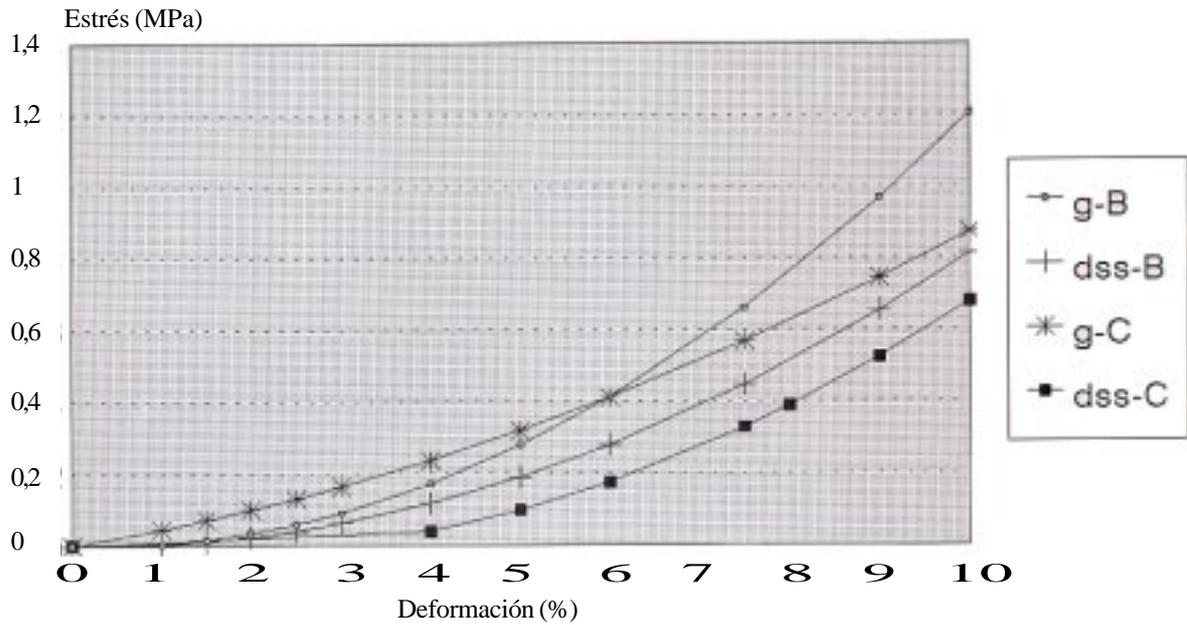


Figura 3 Curvas de estrés/deformación. Valores medios de series gB,dss-B,gC, dss-C

### Valores medios de las series G-B, DSS-B, G-C, DSS-C

Estrés en ordenadas (MPa); deformación en abscisas (%)

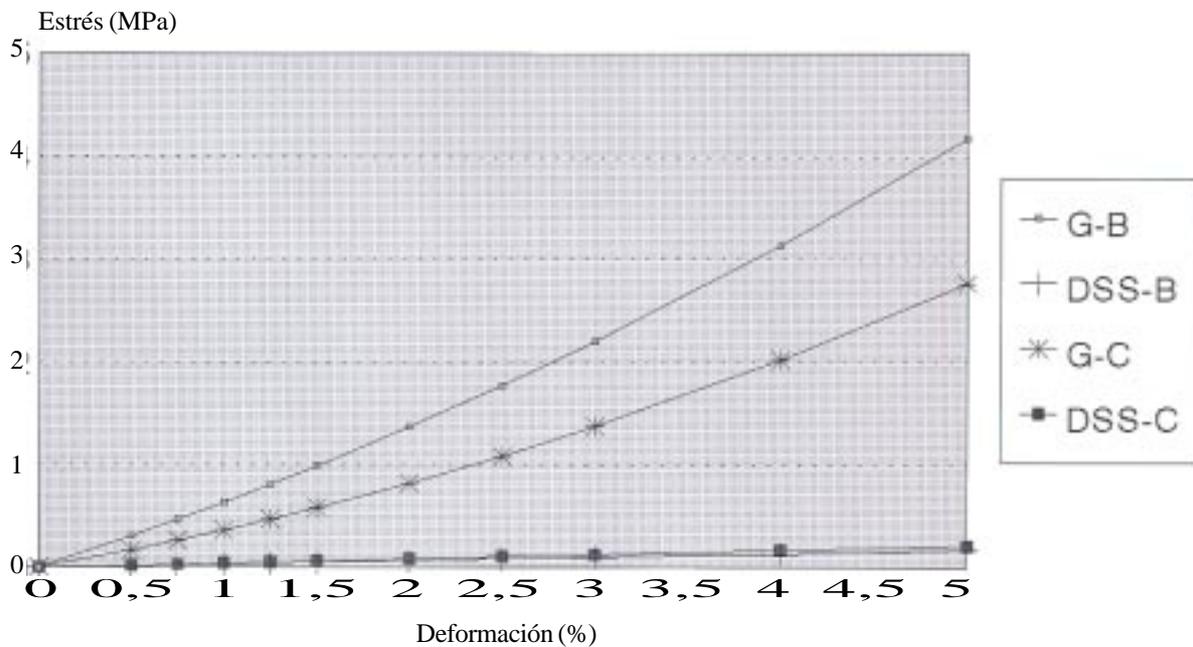


Figura 4 Curvas de estrés/deformación. Valores medios de las series, GB, DSS-B, GC, DSS-C

## Discusión

Los resultados a rotura de las series tratadas con DSS y una incubación de 24 horas (tabla 1b) demuestran que esta forma de tratamiento hace perder la resistencia al estrés de rotura. En el ensayo de tracción los resultados fueron inferiores a 2 MPa, frente a los resultados del grupo de control tratado sólo con GA que presentó un estrés a rotura medio de 29.15 MPa. En la observación macroscópica las muestras estaban hinchadas con espesores entre 3 y 4 veces los espesores medidos en sus muestras gemelas (muestras pareadas), tratadas con glutaraldehído y sin incubación de 24 horas con DSS. Este hecho no se observó en las series tratadas con DSS e incubación de 2 horas, en donde la resistencia a la rotura tras el esfuerzo a tracción es similar a la resistencia observada en las series tratadas con glutaraldehído (9.87 MPa para la serie gB, valor medio frente a 8.42 MPa para la serie dss-B). Similares resultados, aunque mejores, ocurrieron en las series gC y dss-C (tabla 1a).

Podemos afirmar en este punto, que esta incubación (2 horas con DSS), no influye en la rotura. El valor de la resistencia a la rotura es solo un parámetro de referencia en materiales biológicos(30), pero si es útil para descartar como en este caso, una incubación de 24 horas, que empeora o perjudica seriamente el comportamiento mecánico.

Ensayar probetas pareadas permite una correcta comparación de los resultados entre las series,

muestras similares con tratamientos diferentes. Observando nuevamente las tablas 1a y 1b, también hay resultados diferentes con igual tipo de tratamiento como consecuencia de la falta de homogenización del tejido ensayado. Por ello sería aconsejable ensayar con muestras pareadas cuando se comparan tratamientos, como es nuestro caso. Por otra parte, la falta de homogeneidad en la respuesta al estrés puede llevar a una pésima selección de las membranas de pericardio utilizadas en la construcción de velos valvulares cardiacos. La dispersión en los resultados justificaría la variabilidad de la durabilidad de las bioprótesis fabricadas con pericardio de ternera y su fracaso valvular (3,31)

Estudiando el comportamiento mecánico de las distintas series tras la prueba de tracción, se puede establecer matemáticamente dicho comportamiento mediante la siguiente expresión:  $y = a_1x^2 + b_1x$ , siendo y el estrés expresado en MPa y x el porcentaje de deformación en tanto por uno, a y b, los coeficientes.

La constancia de resultados similares en todas nuestras experiencias con biomateriales nos anima a pensar que la expresión definida por Garcia Sestafe, con excelentes coeficientes de determinación ( $R^2$ )(32,33) se ajusta bien para determinar la relación entre el estrés y la deformación de los materiales biológicos.(34,35)

La primera derivada en cada punto de la expresión referida es la tangente y también el módulo de elasticidad. Los módulos de elasticidad se

**Tabla 4** Funciones matemáticas.  $Y = ax^2 + bx$  (coeficientes a, b y  $R^2$ )

Probetas	A	B	$R^2$
GB <sub>1</sub>	462.396	84.773	0.996
GB <sub>2</sub>	348.656	46.016	0.990
GB <sub>3</sub>	363.457	40.207	0.997
GB <sub>4</sub>	562.030	101.238	0.993
GB <sub>5</sub>	468.448	141.402	0.990
GB <sub>6</sub>	853.005	-65.091	0.984
DSS-B <sub>1</sub>	0.449	2.502	0.992
DSS-B <sub>2</sub>	1.799	4.694	0.981
DSS-B <sub>3</sub>	4.797	3.393	0.995
DSS-B <sub>4</sub>	1.798	3.384	0.997
DSS-B <sub>5</sub>	-3.663	4.782	0.994
DSS-B <sub>6</sub>	2.365	1.500	0.975

$R^2$  coeficiente de determinación

Y es el estrés en MPa, x la deformación en tanto por uno.

**Tabla 5** Funciones matemáticas.  $Y = ax^2 + bx$ . (coeficientes a, b y  $R^2$ )

Probetas	A	B	$R^2$
GC <sub>1</sub>	646.771	59.547	0.993
GC <sub>2</sub>	211.534	67.940	0.989
GC <sub>3</sub>	339.274	-11.647	0.994
GC <sub>4</sub>	600.109	23.322	0.993
GC <sub>5</sub>	577.392	53.066	0.998
GC <sub>6</sub>	509.995	-4.584	0.983
DSS-C <sub>1</sub>	-0.022	3.197	0.993
DSS-C <sub>2</sub>	-8.253	7.419	0.977
DSS-C <sub>3</sub>	1.424	3.436	0.994
DSS-C <sub>4</sub>	-0.799	5.257	0.992
DSS-C <sub>5</sub>	7.901	4.986	0.993
DSS-C <sub>6</sub>	3.568	1.518	0.993

$R^2$  coeficiente de determinación

Y es el estrés en MPa, x la deformación en tanto por uno.

incrementan de forma lineal con el estrés, en todas las series ,(pérdida de elasticidad según aumenta la deformación), y en todas existe una inflexión, alrededor del 1% de deformación en las series tratadas con glutaraldehído (gB y gC) y entre 1.5 % y 2.75% en las series tratadas con DSS y 2 horas de tratamiento, (dss-B y dss-C). Estos materiales se describen como viscoso-elásticos y esta inflexión pudiera corresponder a este tipo de comportamiento. Por otra parte las series tratadas con DSS y dos horas de incubación tienen, una mayor elasticidad, ya que sus módulos de elasticidad son siempre menores cuando se comparan con la series pareadas tratadas con glutaraldehído.

Como conclusiones podemos decir que el tratamiento con DSS durante 2 horas no influye en la resistencia mecánica y mejora su comportamiento elástico en el periodo elástico del biomaterial.

Debemos añadir, finalmente la dificultad para de la selección de pericardio para obtener resultados superponibles y lo que es mas importante garantías de durabilidad de las prótesis fabricadas con biomateriales (3,4,5,6,31)

En el apartado de resultados, y a modo de ejemplo y desde un punto de vista de investigación aplicada, hemos realizado el ajuste matemático mediante rectas de regresión, con una excelente correlación ( $r=0.999$ ), entre las muestras pareadas de tal forma que conociendo el comportamiento mecánico de una muestra podremos predecir matemáticamente el comportamiento de su gemela, en este caso con un tratamiento diferente. Con esta manera al seleccionar el biomaterial, para fabricar los velos cardiacos podriamos descartar aquel, cuya muestra gemela no cumpla unas condiciones de resistencia mecánica o de elasticidad fijadas previamente. Sabemos que una gran parte de las bioprotesis fabricadas con pericardio de ternera se rompen precozmente (31), quizá el método de selección de tejido, descrito en este trabajo permita una mejora en dicha selección que pueda ser un nuevo método utilizado para la fabricación de bioprótesis.

### Agradecimientos

A Dolores Patiño por la corección de este trabajo. Al Fiss por su ayuda 96/250, y 00/0192

### Bibliografía

1. **Birkmeyer JD, Marrin CAS, O'Connor GT.** "Should patients with Bjork-Shiley undego prophylactic replacement? Lancet 1992;340:520-523.
2. **Vongpatanasin W, Hillis LD, Lange RA.** "Prosthetic heart valves" N.Engl. J Med.1996;335:407-416.
3. **Bortolotti U, Milano A, Thiene G, Guerra F, Mazzucco A, Valente M, Talenti E and Gallucci V.** "Early mechanical failures of the Hancock pericardial xenograft" J. Thorac Cardiovasc. Surg.1987;94:200-207.
4. **Grunkemeier GL, Jamieson WRE, Miller DC, Starr A.** "Actuarial versus actual risk of porcine structural valve deterioration" J. Thorac Cardiovasc. Surg. 1994;108:709-718.
5. **Bloomfield P, Wheathey DJ, Prescott RJ, Miller DC.** "Twelve-year comparison of aBjork-Shiley mechanical heart valve with porcine bioprostheses" N. Eng.J. Med. 1991;324:573-579.
6. **Schoen FJ, Horson CE.** "Anatomic analysis of removed prosthetic heart valve: causes de failure of 33 mechanical valves and 58 bioprostheses, 1980-1983."Hum. Pathol 1985;16 549-559.
7. **Thubrikar MJ, Deck Dj and Aouad J** "Role of mechanical stress in calcification of aortic bioprosthetic valves" J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 1983;86:115-125.
8. **Jorge E, Fernandez P, Gutierrez M, Castillo-Olivares JL.** "Study of calcification of bovine pericardium: analysis of implication of lipids and proteoglycans" Biomaterials 1991;12 (7):683-689.
9. **Garcia Paez JM, Carrera A, Garcia Sestafe JV, Millan I, Jorge E, Candela I, Castillo-Olivares JL.** "Is cutting stress responsible for the limited durability of heart valve bioprostheses? J.Thorac Cardiovasc. Surg.1990;100:580-586.
10. **Hirsch D, Darder J, Thomas TJ, Schoen Fj, Levy JT, Levy RJ.** "Inhibition of calcification of glutaldehyde pretreated porcine aortic valve cusps with sodium dodecyl sulfate:preincubation and controlled release".J. Biomed Mater. Res. 1993;27:1477-1484.
11. **Jorge E, Fernandez P, De la Torre N, Escudero C, Garcia Paez JM, Bujuan J, Castillo-Olivares JL.** "Inhibition of calcification of porcine valve tissue by selective lipid removal" Biomaterials 1994;15:815-819.
12. **Khorr E, Wee A, Tan BL, Chew TY,** "The efficacy of adual anticalcification of glutaraldehyde-fixed porcine pericardium" J. Mater. Sci. :Mater in Med 1995;6:518-522.
13. **Webb C.L.,Nguyen N.M.,Schoen F.J.,Levy R.J.** "Calcification of allograft aortic wall in rat subdermal model Pathophysiology and inhibition by Al3+ and aminodiphosphonate preincubation Am. J.Pathol. 1992;141:487-496

14. **Webb C.L.,Flowers W.E.,Horton C., Schoen F.J.,Levy R.J.**“Long-term efficacy of Al<sup>3+</sup> for prevention of bioprosthetic heart valve vcalcification. *ASAIO Trans* 1990;36:M408-M410.
15. **Webb C.L.,Flowers W.E.,Boyd J., Rosenthal E.L.,Schoen F.J.,Levy R.J.** “Al<sup>3+</sup> binding studies and metallic cation effects on bioprosthetic heart valve calcification in a rat subdermal model” *ASAIO Trans.*1990;36:56-59.
16. **Hirsch D.,Drader J.,Pathak Y.V.,Yee R.,Schoen F.J.,Levy R.J.**“Synergistic inhibition of the calcificationof glutaraldehyde preteated bovine pericardium in a rat subdermal model by FeCl<sub>3</sub> and ethanehydroxydiphosphonate:preincubation and polymeric controlled release studies”.*Biomaterials* 1993;14:705-711.
17. **Hirsch D.,Schoen F.J.,Levy R.J.** “Effects of metallic ions and diphosphonates on inhibition of pericardial bioprosthetic tissue calcification associated alkaline phosphatasa activity” *Biomaterials.*1993;14:371-377.
18. **Jorge H.E.Fernandez P.,Gutierrez M.,Castillo O.J.** “Study of the calcification of bovine pericardium:analysis of the implication of lipids and proteoglycans” *Biomaterials* 1992;12:683-689.
19. **Lee W.K., Park K.D.,Kim Y.H.,Suh H.,Park J.C. Lee J.E.**“Improved calcification resistance and biocompatibility of tissue patch grafted with sulfonated PEO on heparin after glutaraldehyde fixation” *Biomed Mater Res.*2001;58 27-35.
20. **Lee W.K., Park K.D., Han D.K. Suh H.,Park J.C.,Kim Y.H.** “Heparinized bovine pericardium as a novel cardiovascular bioprosthesis” *Biomaterials* 200;21:2323-2330.
21. **Chanda J., Kuribayashi R.,Abe T.**“Heparine coupling in inhibition of calcification of vascular bioprosthesis”. *Biomaterials* 1999;20:1753-1757.
22. **Jorge H.E.,Fernandez P., Escudero C.,Zurita M.G.,Castillo O.J.** “Influence of stress on calcificación of delipidated bovine pericardial tissue employed in construction of cardiac valves”.*J.Biomed.Mater. Res.*1996;30:411-415.
23. **Dermer D.D.**“Lipid hypotesis of cardiovascular calcification” *Circulation* 1997;95:297-298.
24. **Deiwick M.,Glasmacher B.,Baba H.A.,Roeder N.,Reul H.** “In vitro testing of bioprosthesis:influence of mechanical stresses and lipids on calcification” *Ann.Thorac.Surg.* 1998;66:S206-S211
25. **Rossi M.A., Braile D.M., Texeira M.D.,Souza D.R.,Peres L.C.**“Lipid extraction attenuates the calcific degeneration of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses”*J.Exp.Pathol.(Oxford)* 1990;71;187-196
26. **Cunanan C.M.,Cabiling C.M.,Dinh T.T.,Shen S.H.,Tran-Hata P., Rutledge J.H.**“Tissue chaterization and calcification potential of comercial bioprosthetic heart valves” *Ann. Thorac. Surg.*2001;7;S417-S421.
27. **Shen M.,Kara-Mostefa A.,Chen L.,Daudon M.,TheveninM.,Lacour B.**“Effect of ethanol andether in the prevention of calcification of bioprostheses” *Ann. Thorac.Surg.*2001;7;S413-S416
28. **Purinya B, Kasyanov V, Volkolakov J,Latssis R,Terere G.** “Biomechanical and structural propieties of the expanted bioprosthetic valve leaflets. *J. Biomech* 1994;27:1-11
29. **Gould Pl, Catalogin A and Dhatt GS.** “Stressanalysis of the human aortic valve “ In *computer Structures Vol. 3 Pergamon. Oxford* 1973. pp 377-384.
30. **Hermann Jb.** Tensile strength and knot security of surgical suture materials *Am Surg* 1971;37:209-217.
31. **López Gonzalez CL, Ibarra Perez F, Carreras Gargallo A, et al.** “Rotura temprana de la bioprotesis de xenofic. Nuestra experiencia en 26 implantaciones. *Rev. Esp. Cardiol.* 1983 ;36:925-933.
32. **Garcia Paez JM, Carrera A, Garcia Sestafe JV, Jorge-Herrero E, Navidad R,Cordon a, Candela I, and Castillo-Olivares JL.** “Comparison of the elasticities of the components of cardiac bioprothesis leaflet” *J. Biomed Mater. Res.*1996;30:47-52
33. **Garcia Paez JM, Carrera A, Garcia Sestafe JV; Jorge herrero E, Navidad R, Cordon A,Castillo-Olivares JL.** “Elastic behaviour of suture calf pericardium:influence the suture threads” *Biomaterials* 1996;17:1677-1683.
34. **Timoshenko S.** “Análisis de fatigas y deformaciones. In: *Resistencia de materiales.* Vol. 1.Madrid:Espasa-Calpe, 1970:55-58.
35. **Hooke R.** In: “De potencia restitutiva” London 1678. (referida por Timoshenko en la referencia previa)